

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

PT/EP00/02161  
99/868680

EP00/2161

E.J.U.

REC'D 28 AUG 2000

WIPO

PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-  
gen stimmen mit der  
ursprünglich eingereichten  
Fassung der auf dem näch-  
sten Blatt bezeichneten  
europäischen Patentanmel-  
dung überein.

The attached documents  
are exact copies of the  
European patent application  
described on the following  
page, as originally filed.

Les documents fixés à  
cette attestation sont  
conformes à la version  
initialement déposée de  
la demande de brevet  
européen spécifiée à la  
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

99108496.3

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

I.L.C. HATTEN-HECKMAN

DEN HAAG, DEN  
THE HAGUE,  
LA HAYE, LE

26/05/00





Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

**Blatt 2 der Bescheinigung  
Sheet 2 of the certificate  
Page 2 de l'attestation**

Anmeldung Nr.:  
Application no.: 99108496.3  
Demande n°:

Anmeldetag:  
Date of filing: 30/04/99  
Date de dépôt:

Anmelder:  
Applicant(s):  
Demandeur(s):  
Evotec Analytical Systems GmbH  
40699 Erkrath  
GERMANY

Bezeichnung der Erfindung:  
Title of the invention:  
Titre de l'invention:  
Chemosensitivitätsmessung über Phosphatidylserin

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat:  
State:  
Pays:

Tag:  
Date:  
Date:

Aktenzeichen:  
File no.  
Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation:  
International Patent classification:  
Classification internationale des brevets:  
G01N33/50

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten:  
Contracting states designated at date of filing: AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NL/PT/SE  
Etats contractants désignés lors du dépôt:

Bemerkungen:  
Remarks:  
Remarques:



30. April 1999

990937de Me/kk

29. April 1999

---

Chemosensitivitätsbestimmung über Phosphatidylserin

---

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose.

**Chemosensitivitätstests**

Die Behandlungs- und Heilungserfolge von Tumorerkrankungen haben seit der Einführung der Chemotherapie stark zugenommen. Beispielsweise lag die Überlebensrate bei kindlicher akuter lymphatischer Leukämie (ALL) Mitte der 60er Jahre bei weniger als 10%. Heutzutage liegt die Heilungschance bei über 70%. Die Medikamente, sog. Zytostatika, werden nach bestimmten Therapieplänen allein oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen verabreicht. Mittlerweile gibt es eine unüberschaubare Anzahl verschiedener Therapiepläne, die empirisch ermittelt und ständig weiterentwickelt werden. Das Hauptkriterium für einen verbesserten Therapieplan ist eine bessere Überlebensrate (clinical outcome). Dieses Kriterium trifft für die Mehrheit der Patienten zu. Jedes Individuum besitzt aber eine unterschiedliche Ausstattung an Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Dies trifft insbesondere auf die Eigenschaften von Tumorzellen zu. In einigen Studien konnte gezeigt werden, daß die Therapie für eine Subpopulation extrem gut wirkt,

während sie für andere Patienten aufgrund von medikamentresistenten Tumoren wenig oder überhaupt nicht wirksam ist. (Lacombe et al., Blood, 84, 716-723 (1994), Smit et al. International Journal of Cancer 51, 72-78 (1992)). Dabei konnte gezeigt werden, daß nicht nur die Wirksamkeit verschiedener Medikamente, sondern auch die wirksame Dosis eines Medikamentes individuell unterschiedlich sein kann. Die Ermittlung der individuellen Dosierung eines Medikamentes ist für ~~den Patienten von Bedeutung, damit er einerseits soviel an Medikamenten~~ bekommt, wie für seine Heilung notwendig ist, und damit andererseits die toxischen Auswirkungen der Therapie und das Risiko einer durch die Chemotherapie induzierten sekundären Krebserkrankung so gering wie möglich gehalten werden. So gut die aktuell gebräuchlichen Therapiepläne auch sind, die Fortschritte der letzten Jahre stagnieren hinsichtlich der mittleren Überlebensrate. Eine weitere deutliche Verbesserung der Chemotherapie sollte durch die Erstellung individuell angepaßter Therapiepläne möglich sein.

Um diese Problematik anzugehen haben einige Forscher versucht, die individuelle Sensitivität von Patiententumoren gegenüber Zytostatika *in vitro* zu messen. Die meisten Chemosensitivitätstests, die gegenwärtig verwendet werden, basieren wenigstens teilweise auf dem von Salmon (Salmon et al. Science, 197, 461-463 (1977)) entwickelten Agar-Tumorkultur-Test. Diese Tests messen die Zellproliferation.

Ein zweiter Typ von Chemosensitivitätstests umfaßt den Ausschluß von (Fluoreszenz)-Farbstoffen oder die Freisetzung des radioaktiven Chromisotops  $^{51}\text{Cr}$ , mit dem die Zerstörung der Zellmembran durch direkte oder indirekte Zytostatikawirkung gemessen wird. Eine Modifikation des früheren Farbstoffausschluß-Tests ist der sogenannte DiSC-Assay (Weisenthal, Kern Oncology 5: 92-103 (1991)), der durch einen zweiten Färbeporgang zusätzlich zwischen normalen und Tumorzellen differenziert.



- 3 -

Der dritte Typ von Chemosensitivitätstests bestimmt Parameter des zellulären Metabolismus als Maß für die Schädigung durch Zytostatika. Dieser Testtyp umfaßt den radiometrischen BACTEC-Test (von Hoff D., Forseth B., Warfel L., in Salmon Trent(Eds.) Human tumor cloning, pp. 656-657, Grune & Stratton, Orlando (1984)), den MTT-Test (Freund A. et al. European Journal of Cancer 34:895-901 (1998), Kaspers G.J.L. Blood 92:259-266 (1998), Pieters R. et al. Leukemia 12, 1344-1348 (1998), Klumper E. et al. British Journal of Haematology 93:903-910 (1996), Hwang W.S. et al. Leukemia Research 17:685-688 (1993)) und seinen Variationen, den ATP-Test (Kangas L., Gronroos M., Nieminen A., Medical Biology 62: 338-343 (1984)) und den sogenannten FCA-Test (Meitner P., Oncology 5: 75-81, (1991), Rotman B., Teplitz C., Dickinson K., Cozzolino J., Cellular and Developmental Biology 24: 1137-1146 (1988)).

Agar-Kultur-Assays haben den großen Nachteil, daß bei weitem nicht alle Tumorzellen in den Agar-Kulturen wachsen. Dies gilt insbesondere für lymphatische Leukämien und Lymphome (Veerman A.J.P., Pieters R. British Journal of Haematology 74:381-384 (1990)). Beim bekanntesten Vertreter dieses Assay-Typs, dem Clonogenen Assay, liegt der Prozentsatz von auswertbaren Zellpopulationen nur bei 30-40%. Die Zellen müssen sehr lange (10-20 Tage) wachsen, bevor die Auswertung erfolgt. Außerdem ist der Arbeitsaufwand immens.

Die Farbstoff-Ausschluß-Tests wie auch der  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest bestimmen den Anteil von Zellen mit defekter Zellmembran. Diese Tests beinhalten häufig eine Fixierung und anschließende mikroskopische Auswertung der Zellen bzw. die Messung der Radioaktivität im Überstand. Solche Tests sind aufgrund der Messung eines recht groben Parameters, der Zellmembranintegrität, unspezifisch und können nicht zwischen einer spezifischen Anti-Tumor-Wirkung einer Substanz oder einer physikalischen oder z.B. durch eine starke Verätzung oder Oxidation verursachten Zellschädigung durch eine Substanz unterscheiden. Tests dieses Typs sind folglich

auch bei Substanzen positiv, die generell alle Zellen schädigen und damit nicht als Antitumor-Medikament geeignet sind. Der wohl aussagekräftigste Test des Farbstoff-Ausschluß-Typs ist der DiSC-Test. Durch zweifache Anfärbung kann er im Gegensatz zu anderen Farbstoff-Ausschlußtests zwischen der Zellschädigung von Tumorzellen und normalen Zellen unterscheiden. Die Zweifach-Färbung und die anschließende mikroskopische Auswertung sind aber extrem zeitaufwendig. Außerdem variieren die Ergebnisse abhängig von der Person, die die Auswertung durchführt, und dem Bildausschnitt, der unter dem Mikroskop ausgewertet wird.

Für den radiometrische Tests wie z.B. den  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest gelten ganz generell: Der Einsatz von radioaktiven Isotopen in diagnostischen Tests wird heutzutage wegen des Gefährdungspotentials und der Entsorgungsproblematik zunehmend vermieden. Hinzu kommt, daß inzwischen Fluoreszenz- und Luminiszenztechniken gleiche Sensitivitäten erreichen können bei häufig kürzerer Gesamttestdauer.

Von den Chemosensitivitäts-Tests, die den Metabolismus einer Zelle als Maß für die Proliferation verwenden, wird am häufigsten der MTT-Test und seine Variationen verwendet. Der MTT-Test hat nach einer 4-tägigen Inkubation der Zellen mit diversen Zytostatika eine relativ kurze Testdauer von etwa 4 Stunden. Außerdem können 96 Proben parallel in einer Mikrotiterplatte mittels eines ELISA-Auslesegerätes ausgewertet werden. Dadurch wird ein passabler Durchsatz bei relativ geringem Personalaufwand gewährleistet. Der MTT-Test basiert auf der Umsetzung von 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid in ein blaues Formazan-Produkt. Die Umsetzung wird durch Dehydrogenasen katalysiert, die nur in lebenden Zellen aktiv sind. Der MTT-Test ist abhängig von einer konstitutiven Basisaktivität der untersuchten Zellen. Es hat sich aber herausgestellt, daß einige Zelltypen, z.B. besonders häufig einige FAB-Subtypen von akuter myeloischer Leukämie, eine stark verringerte Dehydrogenaseaktivität besitzen

- 5 -

(Santini V. et al. Hematological Oncology 7:287-293 (1989)). Die Chemosensitivität dieser Tumorzellen kann daher nicht mit einem MTT-Test bewertet werden. Ein weiteres Problem sind die entstehenden wasserunlöslichen Formazankristalle. Diese müssen durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln z.B. Dimethylsulfoxid oder Isopropanol in Lösung gebracht werden. Die Erfahrung hat gezeigt, daß dadurch Probleme bei der Reproduzierbarkeit des Tests auftreten.

## Apoptose

Durch Arbeiten diverser Forschergruppen (z.B. Sen, S. et al. FEBS Lett. 307:122-127, Darzynkiewicz et al. Cytometry 13: 795-808 (1992), Fulda S., Los M., Friesen C., Debatin K.M. Int. J. Cancer 76:105-114 (1998)) erscheint es wahrscheinlich, daß durch Zytostatika verursachter Zelltod generell über den Mechanismus der Apoptose verläuft. Die Apoptose stellt einen von der Zelle selbst programmierten Zelltod dar, der durch physiologische Faktoren im Organismus induziert werden kann oder durch Chemikalien wie Zytostatika ausgelöst werden kann. Der programmierte Zelltod spielt eine außerordentlich große Rolle bei der Zytostase z.B. des Immunsystems. So werden beispielsweise T-Zellen, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, durch die Apoptose aus dem Organismus entfernt. Ansonsten kann es zu Symptomen einer Autoimmunerkrankung kommen, z.B. Lupus Erythematoses, arthritische Erkrankungen oder der Erkrankung durch einen T-Zell Tumor. Substanzen wie der von Makrophagen synthetisierte Tumornekrosefaktor alpha sind natürliche Induktoren der Apoptose.

Apoptose verläuft nach einem programmierten, einheitlichen Schema, bei dem in einer sehr frühen Phase Phosphatidylserin, das sich normalerweise ausschließlich auf der Innenseite der Zellmembran befindet, auf der Außenseite präsentiert wird (Inversion). Dieses Ereignis tritt deutlich früher auf, als die Stunden später

erfolgende Fragmentierung der DNA und Auflösung der Zellmembran in der späten Phase der Apoptose.

Neben dem Zelltod durch Apoptose existiert eine andere Form von Zelltod, die z.B. physikalisch, durch osmotischen Schock, Verätzung oder Oxidation ausgelöste Nekrose. Diese äußert sich durch stark degenerative Schäden an der Zelle.

Medenica (US 5736129) bestimmt das Ausmaß der Zellschädigung durch Zytostatika, indem er die Zellen mit Propidiumiodid anfärbt und anschließend die angefärbten Zellen im FACS (fluorescence activated cell sorter) auszählt. Dieser Ansatz hat aber den großen Nachteil, nicht genau zwischen Apoptose und Nekrose zu unterscheiden, und kann demzufolge den spezifischen Wirkmechanismus von Zytostatika nicht erfassen. Außerdem ist der Zellbedarf für eine aussagekräftige Analyse sehr hoch.

Die Erkennung von auf der Zelloberfläche präsentiertem Phosphatidylserin ist zur spezifischen Detektion von Apoptose bestens geeignet, da die Inversion von Phosphatidylserin ein sehr früher Schritt der Apoptose ist und die Anfärbung sowohl an fixierten, als auch an suspendierten Zellen schnell und leicht durchführbar ist. In bisher beschriebenen Tests wird als Phosphatidylserin bindender Marker stets Annexin V verwendet. Dieses zeichnet sich durch einen sehr niedrigen  $K_d$  von  $5 \times 10^{-10}$  M aus. Nachteilig ist die starke Kalzium-Kationen-Abhängigkeit der Bindung. Diese Tests bestehen alle aus einer Inkubationsphase ohne oder mit Substanzen (z.B. Zytostatika), Sedimentation und Waschen in PBS und anschließender Resuspension in Kalzium-haltigen Färbepuffer mit markiertem Annexin V. Die angefärbten Zellen können anschließend im FACS oder unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt werden. Da alle bisherigen Testprotokolle Waschschrte enthalten und daher zu den heterogenen Assays zählen, sind diese

- 7 -

Tests relativ arbeitsaufwendig und fehleranfällig. Diese Tests sind alle dadurch gekennzeichnet, daß die Apoptose zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Induktion durch Substanzen gemessen wird. Da die Apoptose ein dynamischer Prozeß ist, der ein Maximum durchläuft, das sowohl von der untersuchten Substanz, als auch vom Zelltyp abhängt, und dann in einer sekundären Nekrose ausläuft, ist a priori nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt das Ausmaß der Apoptose gemessen werden muß. Daraus folgt, daß im Prinzip für jeden Patienten mehrere Proben mit z.B.  
Tumorzellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten hinsichtlich der Chemosensitivität bestimmt werden müssen.

Die bisher beschriebenen Phosphatidylserin-Tests ermöglichten keine unmittelbare Messung des zeitlichen Verlaufs der Apoptose. Mit den bisherigen Testvorschriften mußte für eine bestimmte Kombination aus einem Zelltyp und einer Konzentration einer Substanz eine Serie von Experimenten durchgeführt werden, um den zeitlichen Verlauf der Apoptose zu erfassen. Der Zeit- und Personalaufwand, wie auch der Zellmaterialbedarf für einen derartigen Test wäre derart hoch, daß eine hochparallele Testung von wenig Zellmaterial auf Chemosensitivität gegenüber verschiedenen Konzentrationen von vielen Substanzen unmöglich war.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, die genannten Nachteile des Standes der Technik zu überwinden.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose, wobei die Zellen in Gegenwart mindestens eines Markers, dessen Wechselwirkung mit Phosphatidylserin detektierbar ist, mit der mindestens einen Substanz inkubiert werden und die Wechselwirkung zeitlich aufgelöst detektiert wird.

- 8 -

Die hinsichtlich ihrer Chemosensitivität zu untersuchenden Zellen werden in Gegenwart der Substanzen, d.h. gleichzeitig oder mit vorgelegten Markermolekülen, inkubiert. Dadurch wird aus den bisher eingesetzten heterogenen Testprotokollen ein homogener Test "Mix and Measure", der die unmittelbare Messung der Kinetik des apoptotischen Vorganges ermöglicht. Wenn Annexin V als Marker eingesetzt wird, muß sichergestellt werden, daß die Kalziumionenkonzentration während der gesamten Meßzeit konstant und in der optimalen Konzentration bleibt. Dies kann z.B. dadurch erreicht werden, indem die Kalziumionenkonzentration abgepuffert wird. Die Kalziumionen-Abhängigkeit kann gänzlich umgangen werden, wenn anstelle von Annexin V als Marker andere Annexine, Annexinderivate, Annexinmuteine, Antikörper, Fab-Fragmente, single-chain Antikörper, Aptamere und/oder sonstige Proteine mit Bindungsstellen für Phosphatidylserin verwendet werden.

Um den Materialverbrauch weiter zu senken, ist eine Miniaturisierung möglich. Es konnte gezeigt werden, daß Zellen in weniger als 10 µl Medium einige Tage in Kultur gehalten werden können. Durch die Senkung der Zellzahl pro Probenkammer auf  $\leq 1000$  pro Test werden hochparallele Analysen von Proben mit äußerst wenig Patientenzellen, wie z.B. aus Feinnadelbiopsien, ermöglicht. Der geringe Zellbedarf ermöglicht auch die Hochdurchsatztestung (High Throughput Screening /HTS) von unbekannten Substanzen auf anti-Tumorwirkung.

Wenn die Apoptose von Zellen pathologischer Gewebe über die Phosphatidylserininversion getestet wird, ist es von Vorteil, als Referenz gesunde Zellen des Gewebes sowie dieselben Zellen ohne Substanzzusatz mitzutesten. Insbesondere ist es sinnvoll als Kontrolle eine permanente Zell-Linie, deren Chemosensitivität bekannt ist, mitzutesten, um die Funktionalität des Tests zu dokumentieren und Fehler bei der Testdurchführung zu erkennen.

- 9 -

Als Substanzen kommen z.B. folgende Substanzen in Frage:

#### A) Zytostatika

Abrin, Amethopterin, Acivin, Aclacinomycin A, Alanin-Mustard, Altretamin, Aminoglutethimid, Aminopterin, Amsacrin (mAMSA), div. anabolische Steroide, Anthrapyrazol, L-Asparaginase, 5-Axacytidin, Bazillus Calmette-Guerin, Bisantren, ~~Buserelin, Busulfan, Butyryloxyethylglyoxal-dithiosemicarbazon, Camptothecin,~~  
 Carbamat-ester, Carzinophyllin, CCNU, Chlorambucil, Chlorethylmethylcyclohexyl-nitrosoharnstoff, Chlorethylcyclohexylnitrosoharnstoff, Chlorodeoxyadenosin, Corticotropin, Cyproteronacetat, Chlorotrianisen, Chlorozotozin, Chromomycin-A, Cytosinarabinosid (Ara-C), BCNU, Bleomycin, Cis-Platin, Carbo-Platin, Cladribine, Cyclophosphamid, Dactinomycin, Daunomycin, Daunorubicin, Decarbacin, Doxorubicin, DTIC, Dehydroemitin, 4-Demethoxydaunorubicin, Demothodoxorubicin, Deoxydoxorubicin, Dexamethason, Dibromodulcitol, Dichloromethotrexat, Diethylstilbestrol, Bis-(2-chloropropyl)- DL-Serin, Doxifluridin, Elliptiniumacetat, 4'-Epidoxorubicin, Epirubicin, Epoetin alpha, Erythropoeitin, Esorubicin, Estradiol, Etoposid, Fluoxymesteron, Flutamid, Folsäure, Fotemustin, Ftorafur, 4-FU, Fludarabine-Phosphat, 5-FU, Floxuridin, Galactitol, Galliumnitrat, Goserelin, G-CSF, GM-CSF, Hydrea, Hexamethylmelamin (HMM), Hydrocortison, Hydroxyprogesteron, 4-Hydroperoxycyclophosphamid, ICRf 159, Idamycin, Ifosfamid, Immunglobulin IGIV, Interferon, Kobalt-Proporphyrinkomplex, Leucovorin Calcium, Leuprolid, Levadopa, Levothyroxin, Lindan, Liothyronin, Liotrix, Lomustin, Levamisole, Masoprocil, Maytansin, Menogaril, 6-Mercaptopurin, Methosalen, Methylesteron, Methyl-lomustin, Mithracin, Mithramycin, Mitotan, Mitoxantron, Methotrexat (MTX), 6 MP, Mechlorethamin-Hydrochlorid, Medroxyprogesteron, Megestrolacetat, Melphalan, Mesna, Mitomycin-C, Nandrolon, Natriumphosphat P32, Navelbin, Neocarzinostatin, Nitrofururazon, nHuIFNa, nHuIFNb, nHuIFNp,

Octreotidacetat, Ondansetrone Hydrochlorid, Dinatrium-Pamidronat, Pentamethylmelamin (PMM), Pentostatin, Peptiochemio, Plicamycin, Prednimustin, Probroman, Procarbazin, Profiromycin, Paraplatin, Prednisolon, Prednison, RazoxanrIFNa-2a, Rubidazon, rIFNa-2b, rIFNb-1b, rIFNt-1b, rIL-2, rTNF, Semustin, SPG 827 (Podophyllinderivat), Spirogermanium, Streptonigrin, Somatostatin, Streptozocin, Tamoxifen, Taxol, Thio-TEPA, 6-Thioguanin, Tenoposid, Testolacton, Testosteron, 3-TGDR, rTNF, Thyroglobulin, Thyrotropin, Trilostan, Uracil-Mustard, VP-16, Vincristin (VCR), Vinblastin (VBL), Verapamil, Vindesin, Vinzelidin, Vitamin A-Säure, Vitamin A-Analoga, Zinostatin.

---

B) Peptide und Peptoide

C) Nukleinsäuren und -Derivate

D) Peptidnukleinsäuren (PNA's)

E) Hybride aus RNA's, DNA's, PNA's u. Derivate

Zur Erkennung von extrazellulärem Phosphatidylserin müssen Zellen in Gegenwart eines Markers mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert werden. Diese Marker können Antikörper, Fab-Fragmente, single-chain Antikörper, Aptamere und/oder sonstige Proteine mit Bindungsstellen für Phosphatidylserin wie Annexine eingesetzt werden. Diese Marker können einen Farbstoffanteil, kolloidales Edelmetall, ein radioaktives Isotop und/oder Seltenerdenmetallchelate aufweisen.

Die Detektion erfolgt bevorzugt mit Fluoreszenznachweisverfahren, insbesondere auf Basis von konfokaler oder konventioneller Mikroskopie: Die intakten fluoreszenzmarkierten Phosphatidylserin-präsentierenden Zellen werden z.B. mit einer CCD-Kamera aufgenommen und anschließend mit Hilfe eines Bildverarbeitungsprogramms gezählt. Zellen, die sich durch einen DNA-Farbstoff, wie z.B. Propidiumiodid anfärben lassen, werden als nekrotisch angesehen und von



- 11 -

der Zahl der über Phosphatidylserin fluoreszenzmarkierten Zellen abgezogen, so daß die Zahl der apoptotischen Zellen ermittelt wird. Diese wird dann in Bezug zur Gesamtzellmenge gesetzt, die durch automatische Bildauswertung im Phasenkontrast-Mikroskop ermittelt wird. Geeignet wäre aber auch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und konfokale Fluorimetrie, wobei z.B. die Konzentration der fluoreszenten Markermoleküle im Überstand und/oder auf der Zelloberfläche gemessen wird. Bei Mehrfachanfärbungen z.B. durch einen zweiten Marker oder denselben Marker mit einem anderem Fluoreszenzfarbstoff können im Überstand wie auch auf der Zelloberfläche Kreuzkorrelations- oder Zweifarbenkoinzidenzfluorimetrische Messungen durchgeführt werden. Dabei werden bei beiden Verfahren simultan zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe detektiert. Bei der Kreuzkorrelation werden die zeitabhängigen Fluoreszenzfluktuationssignale der beiden Meßkanäle kreuzkorreliert. Bei der Zweifarbenkoinzidenzfluorimetrie gibt es genau dann ein positives Signal, wenn am selben Ort zeitgleich beide Fluoreszenzsignale auftreten. Durch solche Zweifarbenanalysen kann die Spezifität des Nachweises für die Phosphatidylserininvertierung noch gesteigert werden. Von besonderem Nutzen ist die Anwendung von FIDA und PIDA wie in der WO 98/16814 und PCT/EP 98/06165 beschrieben. Dadurch kann die mehrfache Bindung von fluoreszenten Markermolekülen an apoptotische Zellen aufgrund der gesteigerten Fluoreszenzemission leicht gemessen werden. Durch den Einsatz von 2D-FIDA kann die Spezifität noch weiter gesteigert werden. Als sehr leistungsstark hat sich eine Kombination der erwähnten Fluoreszenzmeßtechniken mit einer relativen Bewegung von Proben- und Meßvolumen gegeneinander gezeigt. Da auf diese Weise sehr viel mehr Zellen pro Zeiteinheit beobachtet werden können, verbessert sich die Signalstatistik und damit das Signal/Rausch-Verhältnis drastisch. Insbesondere ist dann auch eine Quantifizierung der Bindung von fluoreszenten Markermolekülen an Zellen möglich.

Durch die Markierung von Phosphatidylserin werden apoptotische Zellen, aber auch Zellen mit defekten Zellmembranen angefärbt, da dann auch die Phosphatidylserine auf der Innenseite der Zellmembranen zugänglich werden. Wenn man den zeitlichen Verlauf der Apoptose verfolgt, so werden zunächst vermehrt intakte, apoptotische Zellen äußerlich angefärbt. Es schnüren sich kleinere ebenfalls angefärbte apoptische Vesikel ab (apoptotic bodies). In der Endphase gehen apoptotische Zellen in die sekundäre Nekrose über und zerfallen. Nekrotische Zellen sind dadurch gekennzeichnet, daß die Zellmembranen in Fragmente zerfallen. Apoptose muß von Nekrose unterschieden werden, damit die Wirkung von wirksamen Zytostatika, die alle über einen Apoptosemechanismus verlaufen, spezifisch detektiert wird. Um zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden, können zusätzlich Marker zum Ausschluß von Nekrosen, zusammen mit dem phosphatidylserin bindendem-Marker eingesetzt werden, beispielsweise Farbstoffe, die mit Nukleinsäuren in Wechselwirkung treten, aber intakte Zellmembranen nicht durchdringen können (z.B. Propidiumiodid , BOBO™ (Molecular Probes)).

Der zeitliche Verlauf der Apoptose kann so mittels der Markierung von Phosphatidylserin "Online" verfolgt werden.

Es ist von Bedeutung, das Ausmaß der Apoptose auf die Gesamtzahl der untersuchten Zellen zu normieren. Dies kann z.B. durch Messung der Lichtabsorption, Streulicht, Leitfähigkeitsmessung oder mikroskopische Auswertung geschehen. Die Normierung ist notwendig, um das Ausmaß der Zellschädigung durch verschiedene Zytostatika vergleichen zu können.

Beispiel:

*Ein stark wirkendes Zytostatikum, das das Wachstum der Zellen unmittelbar stoppt und alle Zellen in Apoptose überführt, kann aufgrund der geringen Zellzahl deutlich weniger Apoptose aufweisen, als im Falle eines schwächer wirkenden Zytostatikums, bei dem sich die Zellen zunächst noch vermehren können, um dann erst später zu einem geringen Teil in Apoptose zu gehen. Erst die Normierung berücksichtigt die Apoptose in Bezug auf die Gesamtzellzahl und bewertet das stärker wirkende Zytostatikum richtig.*

Die Chemosensitivitätstestung von Zellen läßt sich besonders vorteilhaft mit einem Kit durchführen. Dieser Kit beinhaltet einen Probenträger mit mehreren Probenkammern, wobei eine Probenkammer mindestens eine Substanz und einen Marker zur Phosphatidylserindetektion und gegebenenfalls einen Marker zum Ausschluß von Nekrose enthält. Bei dem Probenträger kann es sich z.B. um eine handelsübliche Mikrotiterplatte handeln. Die zu testenden Substanzen und der Marker können dabei entweder als Trockensubstanz, in Lösung oder in Gegenwart von Matrixsubstanzen wie z.B. Salzen, Puffer, Kohlenhydraten, Carbonsäuren, Pyrimidinen, anorganischen oder organischen Nanopartikeln bis 1 µm Durchmesser vorliegen.

## Beispiel

### **Material für die Durchführung des Chemosensitivitätstests:**

- Sterilbank (Holten, Antares)
- Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Jena)

---

- CO<sub>2</sub>-Inkubator (WTC Binder)
- Vortex Mixer (Bender + Hobein AG)
- Kühlschrank (2-10°C) (Bosch)
- Gefrierschrank (-20°C) (Liebherr)
- Autoklav (H+P Labortechnik GmbH)
- Zentrifuge (Eppendorf)
- Pipetten (Eppendorf)
- Pipettenspitzen (ratiolab)
- Mikrotiterplatten (96 Kammern) (Falcon)
- 12,50 ml Röhrchen (Falcon, Greiner)
- RPMI 1640 Medium (Gibco)
- Patientenblut oder -knochenmark
- Annexin V-Alexa 568<sup>TM</sup> (Boehringer Mannheim)
- BOBO<sup>TM</sup> (Molecular Probes)
- Dulbecco's PBS (Gibco)

### **Testdurchführung:**

#### Zellzahlbestimmung

10 µl einer Zellsuspension werden in eine Neubauerkammer eingefüllt. Unter einem Lichtmikroskop werden die Zellen in den 16 Kleinstquadraten gezählt. Durch Multiplikation der Zellzahl mit 10000 erhält man die Zellzahl pro ml.

- 15 -

Präparationen einiger Zytostatika-Lösungen

Substanz	Lösevorschrift
Actinomycin D (Sigma A-1410)	2 mg in 100 µl Ethanol
Cis-Platin (Sigma P-4394)	1 mg in 3.3 ml vollentsalztes (VE), steriles Wasser
Doxorubicin (Sigma D-1515)	1 mg in 1 ml steriles VE Wasser
Methotrexat (Sigma M-9929)	1 mg in 1 ml DMSO + 1 ml steriles VE Wasser
Cytosinarabinosid (Sigma C-1768)	1 mg in 1 ml steriles VE Wasser
Mitoxantron (Sigma M-6546)	2 mg in 1 ml VE Wasser
Daunorubicin (Sigma D-8809)	1 mg in 1 ml PBS
Prednisolon (Sigma P-6004)	10 mg in 1 ml DMSO gelöst

Mischen und Inkubation mit Zytostatika

Die Zellen werden gemeinsam mit 0.5 µg/ml BOBO™ und 50 µM Annexin V-Alexa 568™ in Gegenwart einer konstant 3 mM Kalziumionenkonzentration mit den Zytostatika inkubiert.

### Quantifizierung im Fluoreszenzmikroskop

Im Stundentakt werden pro Probe mit dem in einer CCD-Kamera und Bildauswertungssoftware ausgestatteten Fluoreszenzmikroskop zunächst die durch Annexin V rot fluoreszenzmarkierten Zellen, dann durch die durch BOBO grün markierten Zellen und abschließend die Gesamtheit der Zellen in Phasenkontrast-Modus gezählt. Die durch BOBO angefärbten nekrotischen Zellen werden von der Zahl der Annexin V-positiven Zellen abgezogen und in Bezug zur Gesamtzahl der Zellen gesetzt. Dadurch erhält man den normierten Prozentsatz apoptotischer Zellen. Mit zunehmender Inkubationsdauer steigt der Anteil apoptotischer Zellen zunächst, um nach einigen Stunden wieder abzunehmen, wenn mehr und mehr Zellen in die Endphase der Apoptose, der sekundären Nekrose, übergehen. Das maximale Ausmaß der Apoptose ist ein Maß für die Wirksamkeit eines Zytostatikum.

PatentansprücheEPO-Munich  
52

30. April 1999

1. Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose, wobei die Zellen in Gegenwart mindestens eines Markers, dessen Wechselwirkung mit Phosphatidylserin detektierbar ist, mit der mindestens einen Substanz inkubiert werden und die Wechselwirkung zeitlich aufgelöst detektiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens eine Marker vor und/oder während der Inkubation der Zellen mit der mindestens einen Substanz zugesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen tierische oder humane Zellen sind, insbesondere Leukämiezellen, Zellen solider Tumore, Zellen pathologischer Organe und/oder Referenzzellen wie beispielsweise Zellen aus anderen als den pathologischen Organen oder Zellen aus gesunden Bereichen pathologischer Organe.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Referenzmessung ohne Zusatz der mindestens einen Substanz durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Substanzen pharmazeutische Wirksubstanzen, Chemotherapeutika, Umweltschadstoffe, Peptide, Nukleinsäuren oder Derivate hiervon, PNAs und/oder Nukleinsäurehybride eingesetzt werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Marker Antikörper, Fab-Fragmente, single-chain Antikörper, Aptamere und/oder sonstige Proteine mit Bindungsstellen für Phosphatidylserin wie Annexine eingesetzt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Marker einen Farbstoffanteil, ein kolloidales Edelmetall, ein radioaktives Isotop und/oder Seltenerdenmetallchelate aufweist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß apoptotische Zellen von nekrotischen Zellen unterschieden werden, insbesondere durch Ko-Inkubation mit einem Marker für nekrotische Zellen, insbesondere mit einem mit Nukleinsäuren in Wechselwirkung tretenden Farbstoff, der intakte Zellmembranen nicht durchdringen kann.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß zur Detektion Fluoreszenznachweisverfahren, insbesondere Verfahren auf Basis von konfokaler oder konventioneller Mikroskopie eingesetzt werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die die Zahl der als apoptotisch identifizierten Zellen auf die Gesamtzahl der Zellen normiert wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion mit einer zeitlichen Auflösung von Stunden oder in größeren Zeitabständen erfolgt.



- 19 -

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß als Marker Annexin V in Gegenwart von Calcium im Konzentrationsbereich von 0.1 bis 30 mM, bevorzugt 1 bis 10 mM, verwendet wird.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Suche nach apoptotisch wirkenden Substanzen.
- 
14. Kit enthaltend mindestens ein Zytostatikum und mindestens einen Marker, dessen Wechselwirkung mit Phosphatidylserin detektierbar ist, wobei diese entweder als Trockensubstanz, in Lösung oder in Gegenwart von Matrixsubstanzen vorliegen.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

EPO - Munich  
52

30. April 1999

Zusammenfassung

---

Verfahren zur Bestimmung der Chemosensitivität von Zellen gegen mindestens eine Substanz durch Messung der durch die mindestens eine Substanz ausgelösten Apoptose, wobei die Zellen in Gegenwart mindestens eines Markers, dessen Wechselwirkung mit Phosphatidylserin detektierbar ist, mit der mindestens einen Substanz inkubiert werden und die Wechselwirkung insbesondere zeitlich aufgelöst detektiert wird.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**